

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-052260

(43)Date of publication of application : 24.02.1998

(51)Int.Cl.

C12N 5/02
// A61K 7/06
A61L 27/00

(21)Application number : 08-211046

(71)Applicant : TOYOB0 CO LTD

(22)Date of filing : 09.08.1996

(72)Inventor : TAKAHASHI HIDEKAZU
KITANO TOMONORI
ISHIBASHI TAKUYA
KAWAMURA YOSHIHISA

(54) CELL CULTURE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a culture product which is useful as a substitute for fetal calf serum, as an additive for culture media enabling the reduction in the use of fetal calf serum and as composition for hair growing by culturing mesenchymal cells in a medium containing an extract from epithelial cells as an active ingredient.

SOLUTION: An extract from epithelial cells originating from the product produced in the culture of normal or established epithelial cells is added to the culture medium in an amount of 0.5–100µg protein/ml, preferably 5–50µg protein/ml and a mesenchymal cell, for example, hair papilla cells are cultured in the medium.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 18.07.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3675970

[Date of registration] 13.05.2005

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-52260

(43)公開日 平成10年(1998)2月24日

(51) Int.Cl.⁶
 C 12 N 5/02
 // A 61 K 7/06
 A 61 L 27/00

識別記号

府内整理番号

F I

 C 12 N 5/02
 A 61 K 7/06
 A 61 L 27/00

技術表示箇所

V

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平8-211046

(22)出願日 平成8年(1996)8月9日

(71)出願人 000003160
 東洋紡績株式会社
 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 高橋 秀和
 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 北野 友紀
 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 石橋 卓也
 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞培養方法

(57)【要約】

【課題】間葉系細胞、特に毛乳頭細胞の培養に用いる有効な添加剤を提供する。

【解決手段】表皮細胞抽出成分を有効成分として含有する培地にて間葉系細胞を培養することを特徴とする間葉系細胞、特に毛乳頭細胞の培養方法およびそのための培地添加剤ならびに該添加剤を含む培地。

(2)

特開平10-52260

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表皮細胞抽出成分を有効成分として含有する培地にて間葉系細胞を培養することを特徴とする間葉系細胞の培養方法。

【請求項2】 間葉系細胞が毛乳頭細胞である請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項3】 表皮細胞抽出成分が正常あるいは株化表皮細胞培養物由来の成分である請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項4】 表皮細胞抽出成分を有効成分とすることを特徴とする間葉系細胞培養のための培地用添加剤。

【請求項5】 間葉系細胞が毛乳頭細胞である請求項4記載の間葉系細胞培養のための培地用添加剤。

【請求項6】 表皮細胞抽出成分が正常あるいは株化表皮細胞培養物由来の成分である請求項4記載の間葉系細胞培養のための培地用添加剤。

【請求項7】 表皮細胞抽出成分を有効成分として含有すること特徴とする間葉系細胞培養のための培地。

【請求項8】 間葉系細胞が毛乳頭細胞である請求項7記載の間葉系細胞培養のための培地。

【請求項9】 表皮細胞抽出成分が正常あるいは株化表皮細胞培養物由来の成分である請求項7記載の間葉系細胞培養のための培地。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、間葉系細胞、特に毛乳頭細胞の培養方法及びそのための培地添加剤ならびに該添加剤を含有する培地に関する。

【0002】

【従来の技術】今日、生命科学の分野において、細胞培養技術は盛んに用いられている技術である。このうち、生体内で結合組織を形成している纖維芽細胞、毛乳頭細胞、脂肪細胞、歯鈴細胞などの間葉系細胞の培養技術は、有用物質の評価系や生体モデル系、各種薬剤、粧香品の安全性評価系として広く利用されている。特に、毛髪の根元にある毛乳頭細胞は、毛母細胞と相互作用をして毛幹（いわゆる毛の本体）の成長に深く関わっていることが知られており、毛乳頭細胞の培養技術は毛髪の形成や成長の解明だけでなく、育毛剤の開発、評価、及び生体移植の材料を供するために不可欠な技術である。

【0003】これらの細胞を正常に培養するためには、培地中に別途、細胞増殖因子を添加することが必要である。細胞増殖活性を有する添加剤としては、一般にウシ胎児等の血清が用いられている。しかし、血清は特定不能のあらゆる種類の成分から構成されているため、生命科学分野で実験に用いた場合、原因と結果を論じる際に混乱が生じるという問題がある。また、血清を用いる場合、細胞増殖活性を発現させるためには通常、10%量の添加が必要であり、高価な血清を大量に消費しなければならないという点も問題である。さらに、血清はロット

間の性能差が大きく、その選定に多大な労力が必要とされる。

【0004】くわえて、毛乳頭細胞については、血清成分のみを用いた従来の培養方法ではなかなかうまくいかず、細胞の増殖が遅いうえ、継代数も7代ほどに限られていた。これを克服するために、吉里らは特開平7-274950号公報において、毛乳頭細胞の長期継代培養法として、足裏表皮細胞及び／またはその培養上清とともに培養することを開示している。しかしながら、該特許においても、培養上清を用いるため、特定不能の成分が多数含まれているだけでなく、培養条件によりロット間差が生じるということが考えられる。

【0005】一方、生体内にあって細胞は、性質の異なる種々の細胞種間の相互作用の下で、維持増殖が行われている。特に、上記間葉系細胞により構成されている結合組織は、それと接する皮膚などの上皮組織等と互いに影響しあい、維持増殖を行っている。この相互作用をつかさどる液性因子としては、種々のサイトカイン類、細胞成長因子が知られている。特に、皮膚の上皮細胞である表皮角化細胞はインターロイキン1、インターロイキン6、インターロイキン8、腫瘍壞死因子、顆粒球コロニー刺激因子などを生産することが報告されている。これらの細胞外に産出される細胞外因子の多くは実際に、細胞培養を行う培地の添加剤としても用いられている。これに対し、細胞内因子により構成される表皮細胞の抽出成分については、メラノサイトの培養に用いられた例（R Halaban, et al. Ann. NY Acad. Sci. 548, 180-, '88）があるので、間葉系細胞、特に毛乳頭細胞の培養に用いる添加剤として有効に利用された報告はない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、間葉系細胞、特に毛乳頭細胞の培養に用いる有効な添加剤を見出すことにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ロット間差が大きく、未知成分が多量に含まれる血清成分を、できる限り除くために、表皮細胞抽出成分について鋭意検討を行った結果、間葉系細胞、特に毛乳頭細胞に対し顕著な増殖促進性を有することを見出した。

【0008】すなわち、本発明は表皮細胞抽出成分を有効成分として含有する培地にて間葉系細胞を培養することを特徴とする間葉系細胞の培養方法である。

【0009】また、本発明は表皮細胞抽出成分を有効成分とすることを特徴とする間葉系細胞培養のための培地用添加剤である。

【0010】さらに、本発明は表皮細胞抽出成分を有効成分として含有すること特徴とする間葉系細胞培養のための培地である。

【0011】

【発明の実施態様】本発明の表皮細胞としては、特に限

(3)

特開平10-52260

定されないが、組織由来あるいは培養細胞由來のものが利用可能である。例えばヒトあるいはラットなどの表皮組織や、それら表皮組織から分離培養した正常表皮培養細胞、並びにH a C a T 細胞などの株化された株化表皮細胞などが挙げられる。

【0012】また、表皮細胞抽出成分とは、該表皮細胞から抽出した成分をいう。該成分は例え表皮組織より分離培養した細胞を、コンフレントに達するまで培養した後、細胞を回収し、適当な緩衝液で懸濁させ、超音波破碎機等で細胞を破碎させた後、遠心分離を行い、この上清を回収することにより得ることができる。

【0013】より具体的には、組織あるいは培養物からの細胞の回収には、トリプシン消化した後、生理的食塩水や市販のリン酸緩衝液（日水製薬社製）などを用いることにより行う。そして、この細胞溶液を遠心分離し、沈殿として表皮細胞を回収する。この表皮細胞については、リン酸緩衝液で数回洗浄した後、次の抽出操作に供しても良いし、遠心分離を行って沈殿とし、抽出操作を行うまで凍結保存しても構わない。

【0014】このようにして回収された表皮細胞には適当な緩衝液を加えて懸濁し、細胞破碎を行い、上清を回収することにより、表皮細胞抽出成分を調製する。緩衝液としてはリン酸緩衝液、Tris緩衝液等を用いることができるが、特に限定されない。また、抽出に用いる緩衝液の量は、表皮細胞との体積比で、0.5～10倍量程度の範囲で適宜、選択すれば良い。細胞破碎方法としてはホモジナイザー、超音波破碎、反復凍結融解等の物理的破碎や、浸透圧ショック、酵素処理、界面活性剤等の化学的破碎、及びこれらを組み合わせた方法を用いることができる。

【0015】このようにして調製された表皮細胞抽出成分はタンパク質濃度を測定した後、凍結保存を行う。この時、必要に応じて凍結乾燥を行っても構わない。また、必要であれば、各種分離、精製装置を用いて、有効成分の濃縮、精製を行うことも可能である。

【0016】本発明の培地添加剤は、上記方法により得られた表皮細胞抽出成分を有効成分として含むもので、間葉系細胞の培養に用いるための培地に添加するものである。添加する培地としては、特に限定されないが、DMEM培地やEMEM培地が適用可能である。

【0017】本発明の間葉系細胞とは、組織学的には結合組織を構成する細胞であり、具体的には纖維芽細胞、毛乳頭細胞、脂肪細胞、歯髄細胞などが挙げられる。このような間葉系細胞は、動物から目的とする組織を出し、分離培養を行うことにより得ることができる。例えば、毛乳頭細胞では、ラット類髄毛包より毛乳頭部を抽出し、コラーゲンでコート処理したシャーレに入れ、5%CO₂、37°Cにて10%牛胎児血清含有DMEM培地で培養することにより得る。

【0018】本発明では、表皮細胞抽出成分を有効成分

として含有する培地にて間葉系細胞を培養する。培養方法としては、適当な培地に表皮細胞抽出成分を0.5～100μgタンパク量/ml、好ましくは5～50μgタンパク量/mlになるよう添加し、適当な培養条件において間葉系細胞の培養を行う。この時、別途血清成分を添加する場合は、血清成分添加量を0.5%濃度以下にまで下げることが可能である。例えば毛乳頭細胞の培養においては、表皮細胞抽出成分を50μgタンパク量/mlになるようDME M培地中に添加することにより、別途添加する血清成分を0.5%以下にまで下げることが可能である。

【0019】

【実施例】次に、本発明を具体的に実施例にて説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

参考例1 表皮細胞抽出成分の調製

ヒト表皮由来正常表皮角化細胞（オルガノジェネシス社製）を10ng/ml EGFを含むDMEM：HAM F12 =3:1混合培地にて37°C、10% CO₂ 下で培養した。コンフレントに達した後、培養物をPBSで3回洗浄し、0.05%トリプシン-0.53mM EDTA溶液（ギブコ社製）で覆った。細胞が培養容器から分離した時点で、PBSで細胞を収集し、回収液を1,000回転で5分間遠心分離して、沈殿として細胞を回収した。この沈殿をさらに適量のPBSで懸濁し、再度、遠心分離を行って細胞を回収した。この操作をさらに2～3回繰り返して、細胞を洗浄した後、体積比で2倍量のPBSに懸濁し、細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液を-80°Cで1時間放置して凍結させた後、室温で放置し溶解させた。この操作をさらに1～2回繰り返して、細胞を破壊させた。さらに、これを超音波破碎機にかけ、細胞を破碎させた後、遠心分離を行い上清を回収した。得られた上清を沪過滅菌し、波長280nmにおける吸光度によりタンパク質濃度を測定した後、-80°Cにて凍結させた。こうして、表皮細胞抽出成分を得た。

【0020】参考例2 毛乳頭細胞の分離培養

実体顯微鏡下でラット類髄毛包より毛乳頭を摘出し、牛腱由来コラーゲンIでコート処理した35mmプラスチックシャーレ（コーニング社製）に3個ずつ入れる。これを5%CO₂、37°Cにて10%牛胎児血清含有DMEM培地で培養する。毛乳頭から遊走してきた細胞がコンフレントに達したところで継代し、以後2～3日ごとの培地交換と、約1週間おきの継代を繰り返した。実験には7～8代目のものを用いた。

【0021】実施例1

参考例1で調製した抽出成分を培地添加剤とし、参考例2で分離した毛乳頭細胞を用い、培養を行った。すなわち、牛腱由来コラーゲンIでコート処理した96穴の細胞培養用マイクロプレート（コーニング社製）に毛乳頭細胞を500個/穴になるよう接種し、0.5%牛胎児血清含有DMEM培地にて1日間培養した。次に、参考例1で調製した抽出成分を0, 0.5, 1, 5, 10, 50μgタンパク量/ml

(4)

特開平10-52260

になるよう培地中に添加した。さらに3日間培養を行った後、WST-Iセルカウンティングキット（同仁化学社製）にて細胞数の測定を行い、抽出成分添加時の細胞数を100%としたときの増殖率を算出した。その結果を図1に示す。これにより、5~50μg/ml添加時に約240%の増殖率を示した。

【0022】比較例1

牛膝由来コラーゲンIでコート処理した24穴の細胞培養用マイクロプレート（コーニング社製）に毛乳頭細胞を5000個/穴になるよう接種し、0.5%牛胎児血清含有DMEM培地にて1日間培養した。次に、参考例1で調製した抽出成分を50μgタンパク量/mlに、牛胎児血清を10%になるよう培地中に添加した。さらに1日間培養を行った後、WST-Iセルカウンティングキット（同仁化学社製）にて細胞数の測定を行い、10%牛胎児血清添加での細胞数を1としたときの増殖比率を算出した。その結果を表1に示す。これにより、50μg/ml添加で10%牛胎児血清時とほぼ同等の増殖性を示した。

【0023】

【表1】

牛胎児血清培養時との増殖能の比較

添加物	増殖比率
牛胎児血清 10%	1
参考例1 50μg/ml	0.94

【0024】比較例2

牛膝由来コラーゲンIでコート処理した96穴の細胞培養用マイクロプレート（コーニング社製）に毛乳頭細胞を1000個/穴になるよう接種し、0.5%牛胎児血清含有DMEM

培地にて1日間培養した。次に、参考例1で調製した抽出成分を50μgタンパク量/ml、EGFを10ng/ml、HGFを10ng/mlになるように添加した。さらに3日間培養を行った後、WST-Iセルカウンティングキット（同仁化学社製）にて細胞数の測定を行い、各添加物の添加時の細胞数を100%としたときの増殖率を算出した。その結果を表2に示す。これより、参考例1の抽出成分は10ng/mlのEGF、HGFよりも強い増殖活性を示した。

【0025】

【表2】

各種成長因子との細胞数の比較

添加物	増殖率
抽出成分 50μg/ml	250%
EGF 10ng/ml	159%
HGF 10ng/ml	154%

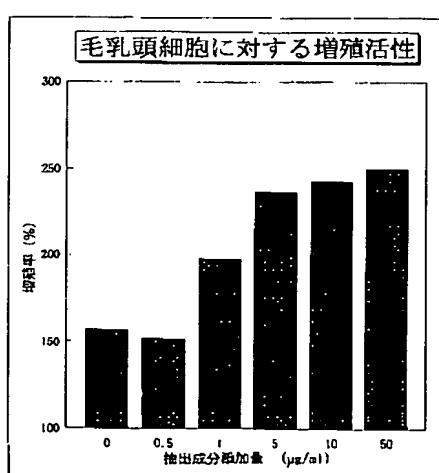
【0026】

【発明の効果】本発明の表皮細胞抽出成分は、間葉系細胞に対して強い増殖活性を示すので、間葉系細胞を培養する際の牛胎児血清の代替品あるいは培地添加剤として利用することができる。また、牛胎児血清と併用することにより、牛胎児血清の使用量を大幅に減少させることができる。さらに、この抽出成分は毛髪誘導に重要な毛乳頭細胞に対して顕著な効果を示すことから、養毛用組成物としての効果も期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】毛乳頭細胞に対する増殖活性を示す図である。

【図1】



(5)

特開平10-52260

フロントページの続き

(72)発明者 川村 良久
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-52260

(43)公開日 平成10年(1998)2月24日

(51)Int.Cl.⁶
 C 12 N 5/02
 // A 61 K 7/06
 A 61 L 27/00

識別記号

府内整理番号

F I
 C 12 N 5/02
 A 61 K 7/06
 A 61 L 27/00

技術表示箇所

V

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平8-211046

(22)出願日 平成8年(1996)8月9日

(71)出願人 000003160
 東洋紡績株式会社
 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
 (72)発明者 高橋 秀和
 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
 (72)発明者 北野 友紀
 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
 (72)発明者 石橋 卓也
 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞培養方法

(57)【要約】

【課題】間葉系細胞、特に毛乳頭細胞の培養に用いる有効な添加剤を提供する。

【解決手段】表皮細胞抽出成分を有効成分として含有する培地にて間葉系細胞を培養することを特徴とする間葉系細胞、特に毛乳頭細胞の培養方法およびそのための培地添加剤ならびに該添加剤を含む培地。

(2)

特開平10-52260

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表皮細胞抽出成分を有効成分として含有する培地にて間葉系細胞を培養することを特徴とする間葉系細胞の培養方法。

【請求項2】 間葉系細胞が毛乳頭細胞である請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項3】 表皮細胞抽出成分が正常あるいは株化表皮細胞培養物由来の成分である請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項4】 表皮細胞抽出成分を有効成分とすることを特徴とする間葉系細胞培養のための培地用添加剤。

【請求項5】 間葉系細胞が毛乳頭細胞である請求項4記載の間葉系細胞培養のための培地用添加剤。

【請求項6】 表皮細胞抽出成分が正常あるいは株化表皮細胞培養物由来の成分である請求項4記載の間葉系細胞培養のための培地用添加剤。

【請求項7】 表皮細胞抽出成分を有効成分として含有すること特徴とする間葉系細胞培養のための培地。

【請求項8】 間葉系細胞が毛乳頭細胞である請求項7記載の間葉系細胞培養のための培地。

【請求項9】 表皮細胞抽出成分が正常あるいは株化表皮細胞培養物由来の成分である請求項7記載の間葉系細胞培養のための培地。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、間葉系細胞、特に毛乳頭細胞の培養方法及びそのための培地添加剤ならびに該添加剤を含有する培地に関する。

【0002】

【従来の技術】今日、生命科学の分野において、細胞培養技術は盛んに用いられている技術である。このうち、生体内で結合組織を形成している纖維芽細胞、毛乳頭細胞、脂肪細胞、歯髄細胞などの間葉系細胞の培養技術は、有用物質の評価系や生体モデル系、各種薬剤、粧香品の安全性評価系として広く利用されている。特に、毛髪の根元にある毛乳頭細胞は、毛母細胞と相互作用をして毛幹（いわゆる毛の本体）の成長に深く関わっていることが知られており、毛乳頭細胞の培養技術は毛髪の形成や成長の解明だけでなく、育毛剤の開発、評価、及び生体移植の材料を供するために不可欠な技術である。

【0003】これらの細胞を正常に培養するためには、培地中に別途、細胞増殖因子を添加することが必要である。細胞増殖活性を有する添加剤としては、一般にウシ胎児等の血清が用いられている。しかし、血清は特定不能のあらゆる種類の成分から構成されているため、生命科学分野で実験に用いた場合、原因と結果を論じる際に混乱が生じるという問題がある。また、血清を用いる場合、細胞増殖活性を発現させるためには通常、10%量の添加が必要であり、高価な血清を大量に消費しなければならないという点も問題である。さらに、血清はロット

間の性能差が大きく、その選定に多大な労力が必要とされる。

【0004】くわえて、毛乳頭細胞については、血清成分のみを用いた従来の培養方法ではなかなかうまくいかず、細胞の増殖が遅いうえ、継代数も7代ほどに限られていた。これを克服するために、吉里らは特開平7-274950号公報において、毛乳頭細胞の長期維持培養法として、足裏表皮細胞及び／またはその培養上清とともに培養することを開示している。しかしながら、該特許においても、培養上清を用いるため、特定不能の成分が多数含まれているだけでなく、培養条件によりロット間差が生じるということが考えられる。

【0005】一方、生体内にあって細胞は、性質の異なる種々の細胞種間の相互作用の下で、維持増殖が行われている。特に、上記間葉系細胞により構成されている結合組織は、それと接する皮膚などの上皮組織等と互いに影響しあい、維持増殖を行っている。この相互作用をつかさどる液性因子としては、種々のサイトカイン類、細胞成長因子が知られている。特に、皮膚の上皮細胞である表皮角化細胞はインターロイキン1、インターロイキン6、インターロイキン8、腫瘍壊死因子、顆粒球コロニー刺激因子などを生産することが報告されている。これらの細胞外に産出される細胞外因子の多くは実際に、細胞培養を行う培地の添加剤としても用いられている。これに対し、細胞内因子により構成される表皮細胞の抽出成分については、メラノサイトの培養に用いられた例（R Halaban, et al. Ann. NY Acad. Sci. 548, 180-, '88）があるので、間葉系細胞、特に毛乳頭細胞の培養に用いる添加剤として有効に利用された報告はない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、間葉系細胞、特に毛乳頭細胞の培養に用いる有効な添加剤を見い出すことにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ロット間差が大きく、未知成分が多量に含まれる血清成分を、できる限り除くために、表皮細胞抽出成分について鋭意検討を行った結果、間葉系細胞、特に毛乳頭細胞に対し顕著な増殖促進性を有することを見出した。

【0008】すなわち、本発明は表皮細胞抽出成分を有効成分として含有する培地にて間葉系細胞を培養することを特徴とする間葉系細胞の培養方法である。

【0009】また、本発明は表皮細胞抽出成分を有効成分とすることを特徴とする間葉系細胞培養のための培地用添加剤である。

【0010】さらに、本発明は表皮細胞抽出成分を有効成分として含有すること特徴とする間葉系細胞培養のための培地である。

【0011】

【発明の実施態様】本発明の表皮細胞としては、特に限

(3)

特開平10-52260

定されないが、組織由来あるいは培養細胞由来のものが利用可能である。例えばヒトあるいはラットなどの表皮組織や、それら表皮組織から分離培養した正常表皮培養細胞、並びにH a C a T 細胞などの株化された株化表皮細胞などが挙げられる。

【0012】また、表皮細胞抽出成分とは、該表皮細胞から抽出した成分をいう。該成分は例えば表皮組織より分離培養した細胞を、コンフレントに達するまで培養した後、細胞を回収し、適當な緩衝液で懸濁させ、超音波破碎機等で細胞を破碎させた後、遠心分離を行い、この上清を回収することにより得ることができる。

【0013】より具体的には、組織あるいは培養物からの細胞の回収には、トリプシン消化した後、生理的食塩水や市販のリン酸緩衝液（日水製薬社製）などを用いることにより行う。そして、この細胞溶液を遠心分離し、沈殿として表皮細胞を回収する。この表皮細胞については、リン酸緩衝液で数回洗浄した後、次の抽出操作に供しても良いし、遠心分離を行って沈殿とし、抽出操作を行うまで凍結保存しても構わない。

【0014】このようにして回収された表皮細胞には適當な緩衝液を加えて懸濁し、細胞破碎を行い、上清を回収することにより、表皮細胞抽出成分を調製する。緩衝液としてはリン酸緩衝液、Trips緩衝液等を用いることができるが、特に限定されない。また、抽出に用いる緩衝液の量は、表皮細胞との体積比で、0.5～10倍量程度の範囲で適宜、選択すれば良い。細胞破碎方法としてはホモジナイザー、超音波破碎、反復凍結融解等の物理的破碎や、浸透圧ショック、酵素処理、界面活性剤等の化学的破碎、及びこれらを組み合わせた方法を用いることができる。

【0015】このようにして調製された表皮細胞抽出成分はタンパク質濃度を測定した後、凍結保存を行う。この時、必要に応じて凍結乾燥を行っても構わない。また、必要であれば、各種分離、精製装置を用いて、有効成分の濃縮、精製を行うことも可能である。

【0016】本発明の培地添加剤は、上記方法により得られた表皮細胞抽出成分を有効成分として含むもので、間葉系細胞の培養に用いるための培地に添加するものである。添加する培地としては、特に限定されないが、DMEM培地やEMEM培地が適用可能である。

【0017】本発明の間葉系細胞とは、組織学的には結合組織を構成する細胞であり、具体的には綿維芽細胞、毛乳頭細胞、脂肪細胞、歯髄細胞などが挙げられる。このような間葉系細胞は、動物から目的とする組織を摘出し、分離培養を行うことにより得ることができる。例えば、毛乳頭細胞では、ラット類鈍毛包より毛乳頭部を摘出し、コラーゲンでコート処理したシャーレに入れ、5%CO₂、37°Cにて10%牛胎児血清含有DMEM培地で培養することにより得る。

【0018】本発明では、表皮細胞抽出成分を有効成分

として含有する培地にて間葉系細胞を培養する。培養方法としては、適當な培地に表皮細胞抽出成分を0.5～100μgタンパク量/ml、好ましくは5～50μgタンパク量/mlになるよう添加し、適當な培養条件において間葉系細胞の培養を行う。この時、別途血清成分を添加する場合は、血清成分添加量を0.5%濃度以下にまで下げることが可能である。例えば毛乳頭細胞の培養においては、表皮細胞抽出成分を50μgタンパク量/mlになるようDME M培地中に添加することにより、別途添加する血清成分を0.5%以下にまで下げることが可能である。

【0019】

【実施例】次に、本発明を具体的に実施例にて説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

参考例1 表皮細胞抽出成分の調製

ヒト包皮由来正常表皮角化細胞（オルガノジェネシス社製）を10ng/ml EGFを含むDMEM：HAM F12 = 3:1 混合培地にて37°C、10% CO₂ 下で培養した。コンフレントに達した後、培養物をPBSで3回洗浄し、0.05%トリプシン-0.53mM EDTA溶液（ギブコ社製）で覆った。細胞が培養容器から分離した時点で、PBSで細胞を収集し、回収液を1,000回転で5分間遠心分離して、沈殿として細胞を回収した。この沈殿をさらに適當量のPBSで懸濁し、再度、遠心分離を行い細胞を回収した。この操作をさらに2～3回繰り返して、細胞を洗浄した後、体積比で2倍量のPBSに懸濁し、細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液を-80°Cで1時間放置して凍結させた後、室温で放置し溶解させた。この操作をさらに1～2回繰り返して、細胞を破壊させた。さらに、これを超音波破碎機にかけ、細胞を破碎させた後、遠心分離を行い上清を回収した。得られた上清を沪過濾滅菌し、波長280nmにおける吸光度によりタンパク質濃度を測定した後、-80°Cにて凍結させた。こうして、表皮細胞抽出成分を得た。

【0020】参考例2 毛乳頭細胞の分離培養

実体顕微鏡下でラット類鈍毛包より毛乳頭を摘出し、牛腱由来コラーゲンIでコート処理した35mmプラスチックシャーレ（コーニング社製）に3個ずつ入れる。これを5%CO₂、37°Cにて10%牛胎児血清含有DMEM培地で培養する。毛乳頭から遊走してきた細胞がコンフレントに達したところで離代し、以後2～3日ごとの培地交換と、約1週間おきの離代を繰り返した。実験には7～8代目のものを用いた。

【0021】実施例1

参考例1で調製した抽出成分を培地添加剤とし、参考例2で分離した毛乳頭細胞を用い、培養を行った。すなわち、牛腱由来コラーゲンIでコート処理した96穴の細胞培養用マイクロプレート（コーニング社製）に毛乳頭細胞を500個/穴になるよう接種し、0.5%牛胎児血清含有DMEM培地にて1日間培養した。次に、参考例1で調製した抽出成分を0, 0.5, 1, 5, 10, 50μgタンパク量/ml

(4)

特開平10-52260

になるよう培地中に添加した。さらに3日間培養を行った後、WST-I セルカウンティングキット（同仁化学社製）にて細胞数の測定を行い、抽出成分添加時の細胞数を100%としたときの増殖率を算出した。その結果を図1に示す。これにより、5~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加時に約240%の増殖率を示した。

【0022】比較例1

牛腱由来コラーゲンIでコート処理した24穴の細胞培養用マイクロプレート（コーニング社製）に毛乳頭細胞を5000個／穴になるよう接種し、0.5%牛胎児血清含有DMEM培地にて1日間培養した。次に、参考例1で調製した抽出成分を50 μg タンパク量／mlに、牛胎児血清を10%になるよう培地中に添加した。さらに1日間培養を行った後、WST-I セルカウンティングキット（同仁化学社製）にて細胞数の測定を行い、10%牛胎児血清添加での細胞数を1としたときの増殖比率を算出した。その結果を表1に示す。これにより、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加で10%牛胎児血清時とほぼ同等の増殖性を示した。

【0023】

【表1】

牛胎児血清培養時との増殖能の比較

添加物	増殖比率
牛胎児血清 10%	1
参考例1 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.94

【0024】比較例2

牛腱由来コラーゲンIでコート処理した96穴の細胞培養用マイクロプレート（コーニング社製）に毛乳頭細胞を1000個／穴になるよう接種し、0.5%牛胎児血清含有DMEM

培地にて1日間培養した。次に、参考例1で調製した抽出成分を50 μg タンパク量／ml、EGF を10ng/ml、HGF を10ng/ml になるように添加した。さらに3日間培養を行った後、WST-I セルカウンティングキット（同仁化学社製）にて細胞数の測定を行い、各添加物の添加時の細胞数を100%としたときの増殖率を算出した。その結果を表2に示す。これより、参考例1の抽出成分は10ng/mlのEGF、HGF よりも強い増殖活性を示した。

【0025】

【表2】

各種成長因子との細胞数の比較

添加物	増殖率
抽出成分 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	250%
EGF 10ng/ml	159%
HGF 10ng/ml	154%

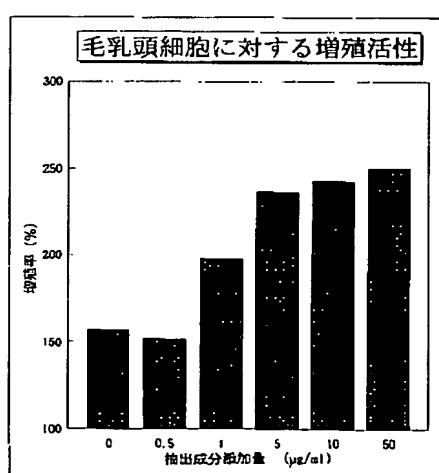
【0026】

【発明の効果】本発明の表皮細胞抽出成分は、間葉系細胞に対して強い増殖活性を示すので、間葉系細胞を培養する際の牛胎児血清の代替品あるいは培地添加剤として利用することができる。また、牛胎児血清と併用することにより、牛胎児血清の使用量を大幅に減少させることができる。さらに、この抽出成分は毛髪誘導に重要な毛乳頭細胞に対して顕著な効果を示すことから、養毛用組成物としての効果も期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 毛乳頭細胞に対する増殖活性を示す図である。

【図1】



(5)

特開平10-52260

フロントページの続き

(72)発明者 川村 良久
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内